

# Die Sensitivierung der Seeigeleier mittels Strontiumchlorid gegen die entwicklungserregende Wirkung von Zellextrakten.

Von

**Jacques Loeb**

(Berkeley, Cal., U. S. A.).

---

Eingegangen am 12. Februar 1910.

1) In früheren Arbeiten<sup>1)</sup> habe ich gezeigt, daß die Prozesse, welche der Bildung der Befruchtungsmembran zugrunde liegen, die Entwicklung des Eies in den Gang setzen. Es gelang ferner der Nachweis, daß Stoffe, welche die Membranbildung hervorrufen, nicht nur im Spermatozoon, sondern auch im Serum und den Gewebsextrakten enthalten sind. Diese letztere Tatsache ließ sich nur bei der Anwendung von artfremden Flüssigkeiten nachweisen, und es zeigte sich ferner bei diesen Versuchen, daß auch gegen artfremdes Serum die Eier des Seeigels meist immun sind, da beispielsweise nur etwa 10 % der Weibchen Eier liefern, welche durch Ochsen Serum zur Entwicklung angeregt werden können. Für das weitere Eindringen in dieses Tatsachengebiet, welches an dasjenige der Immunitätserscheinungen grenzt, war es nötig, eine Methode zu finden, durch welche man die Eier gegen artfremdes Serum und Gewebsextrakte sensitivieren kann. Ich habe eine solche Methode gefunden und will dieselbe, sowie einige mit ihr gefundenen Resultate hier kurz mitteilen.

2) Ich hatte schon früher mitgeteilt, daß die Wirksamkeit von artfremdem Serum sich erheblich steigern läßt, wenn man demselben etwas  $\text{SrCl}_2$  zusetzt<sup>2)</sup>. Man kann aber die Wirksamkeit des

---

<sup>1)</sup> LOEB, Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies. Berlin 1909. — LOEB, Das Wesen der formativen Reizung. Berlin 1909.

<sup>2)</sup> LOEB, PFLÜGERS Archiv. Bd. 124. S. 46. 1908.

Blutserums noch viel erheblicher steigern, wenn man das  $\text{SrCl}_2$  nicht zum Serum zufügt, sondern die Eier, ehe man sie mit dem Serum zusammenbringt, mit einer Lösung dieses Salzes einige Minuten vorbehandelt. Das Verfahren der Empfindlichkeitserhöhung der Seeigeleier gegen artfremdes Serum besteht also darin, daß man erst die Eier in einer mit Seewasser isosmotischen Lösung von  $\text{NaCl}$  wäscht und sie dann in eine  $\frac{3}{8}$  m Lösung von  $\text{SrCl}_2$  bringt. Nach 5—10 Minuten (oder wenn nötig noch später) wird je ein Tropfen Eier aus dieser Lösung in eine Mischung von 1 ccm Seewasser und 1 ccm Serum gebracht. Das letztere muß durch Zusatz von  $\text{NaCl}$  mit dem Seewasser isosmotisch gemacht werden. Man wird finden, daß bei hinreichend langer Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  die Eier fast aller Weibchen gegen artfremdes Serum empfindlich gemacht werden können. Folgendes Beispiel diene zur Erläuterung. Die Eier von sechs Weibchen wurden auf ihre Empfindlichkeit gegen Ochsen Serum geprüft, und kein Ei bildete eine Befruchtungsmembran. Dann wurden die Eier von jedem Weibchen in eine Lösung von  $\text{SrCl}_2$  gebracht, und nach fünf Minuten wurde je ein Tropfen der Eier aus der Lösung in 1 ccm Seewasser und 1 ccm Ochsen Serum gebracht. Das Resultat war, daß nunmehr 50 % der Eier von zwei Weibchen prachtvolle Befruchtungsmembranen bildeten; von den Eiern des dritten bildeten 35 %, von denen des vierten 15 %, von denen des fünften 10 % und von denen des sechsten  $\frac{1}{2}$  % Membranen.

In einem zweiten Falle bildete nach 8 Minuten langer Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  der folgende Prozentsatz der Eier Membranen, wenn sie in der beschriebenen Weise mit Ochsen Serum behandelt wurden. Bei je zwei Weibchen bildeten 98 % der Eier Membranen, bei einem dritten 90 %, bei dem vierten 50 %, bei dem fünften 30 % und dem sechsten 1 %. Ähnlich fielen viel Versuchsreihen aus. Man sieht also, daß es mit dieser Methode möglich ist, die Eier des Seeigels — *Strongylocentrotus purpuratus* wurde zu diesen Versuchen benutzt — in jedem Falle gegen Ochsen Serum empfindlich zu machen.

Es stellte sich auch ferner heraus, daß die Eier, welche besonders empfindlich gegen Ochsen Serum sind, auch dieselbe relativ hohe Empfindlichkeit gegen andre artfremde Säfte zeigen, während die Weibchen, deren Eier nur in geringem Grade durch  $\text{SrCl}_2$  gegen Ochsen Serum sensitiviert werden, ebenfalls in relativ geringem Grade gegen andre artfremde Körpersäfte empfindlich gemacht werden.

Man muß bei diesen Versuchen auch immer einen Tropfen der mit  $\text{SrCl}_2$  vorbehandelten Eier in Seewasser ohne Serum bringen, da namentlich bei längerer Vorbehandlung (10–30 Minuten) mit der  $\text{SrCl}_2$ -Lösung die Eier nach der bloßen Übertragung in Seewasser Membranen bilden können. Aber das ist nicht häufig der Fall und dann meist auch nur bei wenig Eiern. Um aber Irrtümer zu vermeiden, muß man stets diesen Kontrollversuch anstellen.

Wenn die Eier nach der Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  in Seewasser zurückgebracht werden, verlieren sie ihre hohe Empfindlichkeit nicht sofort. Spuren der Sensitivierung konnten gelegentlich noch 12 Stunden nach der Übertragung in Seewasser gefunden werden.

Die Eier, welche nach der Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  unter dem Einfluß von Serum eine Membran bildeten, entwickelten sich zum Teil zu normalen Pluteen, wenn man sie hinterher kurze Zeit mit einer hypertonischen Lösung behandelte.

3) Aus den im Anschluß an diese Methode der Sensitivierung angestellten Versuchen will ich nur einige erwähnen. Ich wollte zunächst feststellen, ob bei verschiedenen Formen die relative membranbildende Wirkung von totem Samen und von Gewebsextrakten parallel läuft. Ich wählte dazu drei verschiedene Formen von Seesternen, *Asterias*, *Pycnopodia* und *Asterina*. Die Wahl war veranlaßt durch meine früheren Versuche über heterogene Hybridisation, welche ergeben hatten, daß die Befruchtung der Eier von *Purpuratus* mit dem Samen von *Asterias* viel leichter gelingt als mit dem Samen von *Pycnopodia*, und mit dem letzteren Samen leichter als mit dem Samen von *Asterina*.

Der Same dieser drei Seesternarten wurde durch Erhitzen auf 60 Grad getötet. Nach dem Abkühlen wurden Suspensionen der drei toten Samenflüssigkeiten hergestellt, die den gleichen Grad der Trübung besaßen. Zum Versuch dienten die Eier eines *Purpuratus*-Weibchens, die gegen den toten Samen von *Pycnopodia* und *Asterina* immun waren und von denen nur 2 % mit dem toten Samen von *Asterias* Membranen bildeten.

Die Eier wurden dann 10 Minuten mit  $\text{SrCl}_2$  vorbehandelt, und nun bildeten mit dem toten *Asterias*-Samen 80 % der Eier, mit dem von *Pycnopodia* 10 % und mit dem von *Asterina* 0 % Membranen. Erst nach einer Vorbehandlung von 15 Minuten mit der Lösung von  $\text{SrCl}_2$  wurden die Eier gegen *Asterina*-Samen soweit empfindlich, daß eine kleine Zahl, weniger als 1 %, mit dem toten *Asterina*-Samen

Membranen bildete. Die Ordnung der Wirksamkeit der drei toten Samenarten ist also: *Asterias*, *Pycnopodia*, *Asterina*. Dieses Resultat wurde an den Eiern von drei andern Weibchen mit dem toten Samen von andern Männchen derselben drei Arten bestätigt.

Es wurde nun ein Extrakt vom sogenannten Cöcum — dem Darm mit den Verdauungsdrüsen — von weiblichen Exemplaren der drei Seesternarten hergestellt. Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurde je ein Volum von 25 ccm solcher Cöca, die vorher durch Waschen in Seewasser von den Fäces befreit waren, mit je 75 ccm Seewasser im Mörser zerrieben und das Filtrat zu den Versuchen benutzt. Die Eier des vorhin erwähnten *Purpuratus*-Weibchens wurden zu den Versuchen benutzt. Zu je 1 ccm Seewasser wurden 4 Tropfen Cöcumextrakt von *Asterias* und je 12 Tropfen Cöcumextrakt von *Pycnopodia* und *Asterina* zugefügt. Die nicht vorbehandelten Eier waren immun gegen den Cöcumextrakt von *Pycnopodia* und *Asterina*, waren aber mäßig empfindlich gegen den Cöcumextrakt von *Asterias*, indem nämlich 15 % der Eier unter dem Einfluß des letztern Membranen bildeten.

Dann wurden die Eier 10 Minuten lang in die Lösung von  $\text{SrCl}_2$  gebracht, und nun bildeten 85 % der Eier Membranen mit dem Cöcumextrakt von *Asterias*, 10 % mit dem Cöcumextrakt von *Pycnopodia* und 5 % mit dem von *Asterina*. Auch dieser Versuch wurde mit Eiern und Samen von andern Individuen wiederholt, und die Resultate waren von derselben Ordnung.

Diese Versuche beweisen also, daß für die gewählten Arten ein Parallelismus besteht zwischen der membranbildenden Wirksamkeit des Samenextraktes und des Cöcumextraktes.

4) Eine andre Frage, die sich aufdrängte, war die, ob die Vorbehandlung der Eier mit  $\text{SrCl}_2$  auch das Eindringen artfremder lebender Spermatozoen in das *Purpuratus*-Ei erleichtert. Zu dem Zweck wurden *Purpuratus*-Eier nach der Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  nicht nur wie vorhin dem Einflusse toten, sondern auch dem lebenden Samens unterworfen. Es stellte sich heraus, daß bei mäßiger Verdünnung der lebende *Asterias*-Samen, wenn überhaupt, nur wenig wirksamer auf das mit  $\text{SrCl}_2$  vorbehandelte *Purpuratus*-Ei ist als der tote. Das erweckt den Eindruck, als ob die Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  nur die Empfindlichkeit der Eier gegen die Lysine des Samens erhöht, namentlich gegen die im Seewasser gelösten Lysine der artfremden Spermatozoen; daß dagegen das Eindringen der Sperma-

tozoen von *Asterias* in das *Purpuratus*-Ei durch diese Vorbehandlung nicht begünstigt wird.

Es ist aber eine Tatsache, daß die mit  $\text{SrCl}_2$  sensitivierten *Purpuratus*-Eier, wenn sie in normalem Seewasser mit lebendem *Asterias*-Samen behandelt werden und Membranen bilden, nur anfangen, sich zu furchen, daß sie aber bei Zimmertemperatur nie sich zu Larven entwickeln. Das beweist, daß kein Spermatozoon in das Ei eingedrungen ist; denn wenn ein *Asterias*-Spermatozoon in das *Purpuratus*-Ei eintritt, so entwickelt es sich bei Zimmertemperatur zur Larve. Auf die mit  $\text{SrCl}_2$  sensitivierten *Purpuratus*-Eier wirkt also der lebende *Asterias*-Same in derselben Weise wie der tote, nämlich nur durch die im Samen enthaltenen und im Seewasser löslichen Lysine.

Hierin unterscheidet sich nun die Sensitivierung der *Purpuratus*-Eier mit Strontiumchlorid sehr wesentlich von meiner vor sieben Jahren mitgeteilten Methode der Hybridisierung der *Purpuratus*-Eier mittels Seesternsamen. Diese Methode bestand darin, daß ich Eier von *Purpuratus* und lebenden Samen von *Asterias* in hyperalkalisches Seewasser (50 ccm Seewasser 0/6 ccm N/10 NaHO) brachte. In diesem Falle bildeten meist alle Eier eine Befruchtungsmembran, und ein Teil der Eier entwickelte sich zu Gastrulen und Pluteen. Wenn man aber in derselben Lösung (durch Erhitzen auf 60°) abgetöteten *Asterias*-Samen zu den *Purpuratus*-Eiern zufügt, so bilden dieselben meist keine Membranen, oder jedenfalls nicht mehr Membranen, als dieselben Eier auch in normalem Seewasser unter dem Einfluß von *Asterias*-Samen bilden, und wenn es so ausnahmsweise zur Membranbildung kommt, so findet hinterher keine Entwicklung statt. Das hyperalkalische Seewasser erleichtert also nur das Eindringen des lebenden Spermatozoons von *Asterias* in das Ei von *Purpuratus*. Dagegen erhöht das Alkali nicht oder nur wenig die Empfindlichkeit des *Purpuratus*-Eies gegen die im Seewasser gelösten Lysine des toten oder lebenden *Asterias*-Samens. Die Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  erhöht dagegen die Empfindlichkeit des Eies für die im Seewasser gelösten Lysine des toten und lebenden *Asterias*-Samens, oder vielmehr für Lysine überhaupt. Möglicherweise erhöht die Vorbehandlung des Eies mit  $\text{SrCl}_2$  die Durchgängigkeit des Eies für diese Lysine.

5) Die Tatsache, daß die Behandlung der *Purpuratus*-Eier mit  $\text{SrCl}_2$  das Eindringen von *Asterias*-Samen in dieselben nicht erleichtert,

beruht auf zwei nebensächlichen Umständen, die aber von Interesse sind. Ich habe wiederholt darauf hingewiesen, daß die Entwicklungserregung des Eies durch ein Spermatozoon durch mindestens zwei verschiedene in dem letzteren enthaltene Stoffe zustande kommt. Der erste ist ein Stoff, der die Cytolyse der sogenannten Rindenschicht des Eicytoplasmas und damit die Membranbildung bewirkt. Dieser Stoff ist offenbar an der Oberfläche des Spermatozoons enthalten, denn es genügt nur, daß dasselbe mit der Oberfläche des Eies in intime Berührung kommt, um die Membranbildung zu bedingen. Für die Wirkung des zweiten Agens ist aber das Eindringen des Spermatozoons in das Ei nötig. Der cytolytisch wirkende Stoff, den wir hier der Kürze halber stets als Lysin bezeichnet haben, regt die Membranbildung an, und damit auch die Entwicklung; aber das Ei kränkelt offenbar und kann sich bei Zimmertemperatur nicht entwickeln, wenn nicht der zweite Stoff ebenfalls in das Ei gelangt, oder wenn dessen Wirkung nicht durch eine entsprechende Behandlung des Eies ersetzt wird. Wenn man nun *Purpuratus*-Eier mit lebendem *Asterias*-Samen in hyperalkalischem Seewasser zusammenbringt, so dauert es geraume Zeit, oft 10 Minuten, bis die ersten Eier eine Membranbildung zeigen; und es dauert 50 Minuten oder länger, bis alle Eier ihre Befruchtungsmembran bilden. Wenn man das weitere Verhalten dieser Eier verfolgt, so findet man zwei Arten von Eiern; nämlich solche, welche nur eine Membran gebildet haben, aber dann in den ersten Stadien der Furchung zerfallen, und solche, welche sich regelmäßig furchen und zu Larven entwickeln. Wie mein Assistent, Herr ELDER, festgestellt hat, ist nur in die letzteren Eier ein Spermatozoon eingedrungen.

Befruchtet man aber die Eier desselben *Purpuratus*-Weibchens mit *Purpuratus*-Samen, so bilden die Eier bereits in 1—2 Minuten eine Membran, und in 3—4 Minuten ist die Membranbildung meist bei vielen oder allen Eiern vollendet. Alle Eier, welche eine Membran bilden, entwickeln sich auch zu Larven.

Was bedingt nun diesen charakteristischen Unterschied im Verhalten der *Purpuratus*-Eier beiden Arten von Samen gegenüber? Ich glaube, der Unterschied ist dadurch bedingt, daß die Geschwindigkeit, mit der das Spermatozoon die Oberflächenlamelle des *Purpuratus*-Eies durchdringt, erheblich größer ist für das Seeigelspermatozoon als für das *Asterias*-Spermatozoon. Sobald die Spitze eines Spermatozoonkopfes mit der Oberflächenlamelle des Eies in innige Berührung kommt, beginnt sich das Lysin des Spermatozoons in der

Rindenschicht des Eies zu lösen. Das bedingt die Membranbildung. Die abgehobene Oberflächenlamelle, die sogenannte Befruchtungsmembran, ist für das Spermatozoon undurchgängig, wie ich durch Versuche an Eiern mit Buttersäuremembran gezeigt habe. Ist nun das Spermatozoon imstande, die Oberflächenlamelle des Eies so rasch zu durchdringen, daß es schon in das Ei eingedrungen ist, ehe das Lysin Zeit gehabt hat, die Bildung der Befruchtungsmembran herbeizuführen, so kommt es zur normalen Entwicklung des Eies. Das ist bei der Befruchtung des *Purpuratus*-Eies mit dem *Purpuratus*-Samen fast immer, und bei der Befruchtung desselben Eies mit *Asterias*-Samen in hyperalkalischem Seewasser in einem gewissen Prozentsatz der Eier der Fall. Die übrigen *Asterias*-Spermatozoen dringen so langsam durch die Oberflächenlamelle des Eies, daß das Lysin des Spermatozoons Zeit hat, sich im Ei zu lösen und die Abhebung der Befruchtungsmembran herbeizuführen, ehe das Spermatozoon selbst durch die Oberflächenlamelle durchgedrungen ist. Ist aber die Befruchtungsmembran einmal gebildet, so ist damit dem Spermatozoon der Eintritt in das Ei unmöglich gemacht.

Diese Überlegungen machen nun auch klar, wie es kommt, daß die Sensitivierung der Eier mit  $\text{SrCl}_2$  die heterogene Hybridisation derselben mit *Asterias*-Samen nicht erleichtert. Gerade die Erleichterung der Membranbildung, welche durch die Strontiumbehandlung der Eier herbeigeführt wird, muß es für Spermatozoen, welche relativ viel Zeit brauchen, um die Oberflächenlamelle des Eies zu durchdringen, schwer machen, in das Ei zu gelangen. Wenn man die Eier mit Strontiumchlorid behandelt und sie dann hinterher dem toten oder lebenden Samen von *Asterias* aussetzt, so dauert es nur etwa 2 Minuten, bis die Eier Membranen bilden, während die Membranbildung und das Eindringen von lebendem *Asterias*-Samen in das *Purpuratus*-Ei meist erst nach 10 Minuten oder später beginnt. Man ist also nicht berechtigt zu sagen, daß die Sensitivierung der *Purpuratus*-Eier mit  $\text{SrCl}_2$  die heterogene Befruchtung derselben direkt erschwert. Diese Erschwerung ist nur eine indirekte Wirkung der Sensitivierung derselben mit  $\text{SrCl}_2$ , und sie ist nur in solchen Fällen zu erwarten, in denen das heterogene Spermatozoon sich nur langsam in das Ei einbohrt oder bzw. nur langsam durch Oberflächenkräfte in das Ei aufgenommen wird.

Die Richtigkeit dieser Überlegungen wird nun durch folgende Tatsache bestätigt. Es gibt hier zwei Arten von *Strongylocentrotus*, *purpuratus* und *franciscanus*. Eine Hybridisation der beiden Arten

ist meist nur in beschränktem Maße ausführbar. Ich habe nun gefunden, daß eine Vorbehandlung der Eier von der einen Seeigelart mittels  $\text{SrCl}_2$  die Befruchtungsfähigkeit derselben mit dem Samen der andern Seeigelart durchweg erhöht. Die Zahl der durch den Samen der andern Art befruchteten Eier war oft zweimal so groß oder noch größer, wenn die Eier mit  $\text{SrCl}_2$  vorbehandelt waren, als wenn das nicht der Fall war. Alle diese Eier entwickelten sich zu Larven. In diesem Falle handelt es sich um Spermatozoen, die so rasch die Oberflächenlamelle des Eies durchsetzen, daß sie schon im Ei sind, ehe das von ihnen an das Ei abgegebene Lysin Zeit hat, die Bildung der Membran herbeizuführen.

6) Es würde der Absicht dieses Aufsatzes — der nur einen Glückwunsch zur Feier des hochverehrten Begründers der Entwicklungsmechanik und Vorkämpfers für die moderne Biologie überbringen soll — widersprechen, wenn ich in zu viele Details eingehen wollte. Ich möchte aber kurz noch auf die Frage nach der Immunität der Seeigeleier gegen die Lysine des eignen Körpers eingehen.

Es wurde schon in früheren Arbeiten erwähnt, daß es mir nie gelungen ist, bei den Eiern von *Purpuratus* die Membranbildung durch toten *Purpuratus*- oder toten *Franciscanus*-Samen herbeizuführen. Nach dem Auffinden der Sensitivierungsmethode nahm ich diese Versuche wieder auf. Das Resultat ist auch weiter negativ geblieben. Auch Eier, welche gegen artfremdes Serum oder toten artfremden Samen durch  $\text{SrCl}_2$  höchst empfindlich gemacht waren, bildeten keine Membranen, wenn sie mit dem langsam auf  $60^\circ$  erhitzten Seeigelsamen, selbst in sehr hoher Konzentration, behandelt wurden. War der arteigene Samen wirklich abgetötet, so veranlaßte er auch nie eine Membranbildung. Artfremder Samen, der auf  $60^\circ$  erhitzt war, rief im allgemeinen bei den durch Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  sensitivierten *Purpuratus*-Eiern die Membranbildung hervor. Ich habe solche Versuche mit dem Samen von Würmern, Mollusken, Crustaceen, Haifischen und selbst Warmblütern (Hahn) ausgeführt.

Ich ging dann zu Versuchen mit dem Extrakt aus dem Darm weiblicher Seeigel über. Hierbei gelang es mir nach vielen negativen Versuchen, mit dem Extrakt von *Franciscanus*-Darm bei etwa 5 % der Eier eines einzigen *Purpuratus*-Weibchens eine Membranbildung herbeizuführen; vorausgesetzt, daß die Eier mit  $\text{SrCl}_2$  vorbehandelt waren. Der wirksame Extrakt hatte bereits 5 Tage ge-



standen. Frisch bereiteter *Franciscanus*- und *Purpuratus*-Darm-extrakt blieb bei den mit  $\text{SrCl}_2$  vorbehandelten Eiern desselben Weibchens wirkungslos. Die Beobachtung beweist, daß es möglich ist, durch Vorbehandlung mit  $\text{SrCl}_2$  die Immunität der Seeigeleier gegen die Lysine der eignen Körperzellen zu durchbrechen. Es ist aber ungleich leichter, die *Purpuratus*-Eier gegen die Körpersäfte fremder Arten als gegen die eignen zu sensitivieren. Auf die mögliche Bedeutung dieser Tatsache für die Theorie der Immunität der Zellen gegen die Lysine des eignen Körpers habe ich schon früher hingewiesen.

---